第 43 卷 第 4 期
2000 年 11 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43，No.4
Nov.，2000

文章编号：0454-6296（2000）04-0373-07

温度对野蚕黑卵蜂寄主利它素的影响

高其康，胡　萃
（浙江大学，杭州　310029）

摘要：利它素粗提液或涂利它素粗提液的人造卵经不同温度（25℃、60℃或 100℃）处理 30 min 后进行生物活性测定，发现各温度下利它素仍对野蚕黑卵蜂有很强的引诱活性，其平均反应级数与常温（25℃）相比无明显差异，表现出一般蛋白质所没有的热稳定特性。低温（4℃、0℃、－20℃或－70℃）同样也能保存粗提液中利它素的生物活性，但发现能引起粗提液发生凝集，且 0℃以下比 4℃能产生更多的凝集，使粗提液中利它素活性组分含量减少，－20℃时，其活性组分的峰面积仅为对照的 13.1%，表现出一般蛋白质所没有的低温敏感性，这一发现对利它素的快速、简捷、有效分离具有重要的指导意义。

关键词：野蚕黑卵蜂；利它素；温度
中图分类号：Q965　　　**文献标识码**：A

利它素（kairomone）作为特殊的种间交流信息物质，在寄生蜂的寄主识别和接受过程中起着重要的作用。国内外有关非挥发性类寄主识别利它素的来源、性质等方面有一定的报道[1~3]。对利它素活性影响因子的研究[4,5]发现只有在人工卵的形状和大小与寄主卵的相近时，其利它素的活性才得到充分发挥，寄生蜂的寄生率才最高，其它环境因子的研究还未见报道。1990 年起，我们对野蚕黑卵蜂 *Telenomus theophilae* 的寄主识别行为及其理化基础进行了较系统的研究，发现该蜂对寄主的鉴别行为相当严格，寄生成功的野蚕黑卵蜂可分成检验、探查、钻入、产卵和标记五个阶段的连续行为[6]，这些寄主识别行为与野蚕黑卵蜂触角上的感器有密切关系，对触角及其感器的超微结构和切除试验证实了触角上存在的一些特殊感器在寄主识别和接受上起着重要作用[7,8]。进一步研究发现野蚕黑卵蜂识别和接受寄主卵，是因为寄主卵上存在着一种来自寄主野桑蚕 *Theophila mandarina* 雌蛾的性附腺分泌物中的大分子非挥发性物质，同时发现之所以能用桑蚕 *Bombyx mori* 卵替代其自然寄主进行室内人工繁育，也是由于桑蚕卵上存在着与野桑蚕卵上性质相同的物质，也来自于桑蚕雌蛾性附腺[9]，这一发现对我们进一步对利它素进行全方位研究提供了实验材料的保证。桑蚕雌蛾性附腺分泌物在蚕种生产中特有的作用，对其性质方面的研究已有报道[10,11]，证实为非糖蛋白的蛋白质。本文以环境中的主要因子温度对野蚕黑卵蜂替代寄主附腺分泌物粗提液的影响进行研究，以探明温度对附腺粗提液中利它素的影响程度和方式，为利它素的快速分离，田间应用及进一步的分子生物学研究提供依据。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39070589）；浙江省自然科学基金资助项目（398255）
收稿日期：1997-11-16；修订日期：2000-02-18

1 材料与方法

1.1 材料

试验所需的利它素粗提液是从桑蚕（浙江大学蚕蜂系蚕种室提供，品种为兰天白云）雌蛾性附腺贮藏部经剪碎，加等体积双蒸水，8 000 r/min 离心 15 min 得到的上层液；生物测定所需的野蚕黑卵蜂是在（25±0.5)℃，14L:10D 的生化培养箱内用桑蚕卵繁育获得；人造卵由锡制成，大小形状与寄主卵相仿。

1.2 高温对粗提液中利它素活性的影响

把粗提液进行如下处理：处理Ⅰ：将粗提液涂于与寄主卵形状相仿的人造卵上，按图1模式排列于平底凹玻片中，分别置于室温（对照，25℃）和60℃或100℃的烘箱中30 min，每处理一片，每片5粒人造卵，处理后室内自然冷却待测。

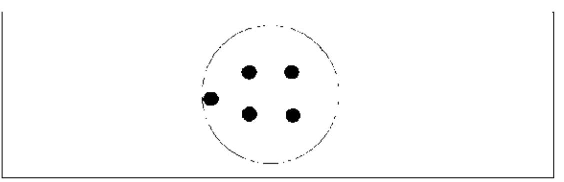


图1 “4+1”模式图（黑点为人造卵）
Fig. 1 Model plan of “4+1”
(Black points are artificial eggs)

处理Ⅱ：将粗提液分装于3个eppendorf管中，每管200 μL，置于室温（对照，25℃）和60℃或100℃烘箱中30 min，自然冷却，再分别涂于人造卵上，按图1模式排列于平底凹玻片中，自然干燥后待测。

1.3 低温对利它素粗提液活性及蛋白质组分的影响

取5 mL桑蚕雌蛾性附腺粗提液，分装于5个eppendorf管中，每管1 mL，其中第1～4管分别置于4℃、0℃、-20℃、-70℃下保存，第5管（对照）中取50 μL马上进行生物测定，留下的0.95 mL进行高效液相色谱分离。保存135天后，4 000 r/min 离心5 min，各取上清50 μL进行生物测定，余下上清供高效液相色谱分离。在Shimadzu LC-6A型高效液相色谱仪中进行分离，柱为Diol 150型分子筛柱，流动相缓冲液为0.02 mol/L磷酸缓冲液（用前径真空抽滤）(pH7.0)，流速为1 mL/min，检测波长为280 nm，手动按峰收集，各收集样用Sephadex G25浓缩至0.5 mL，分别涂于人造卵上，按图1模式排列于平底凹玻片中，自然干燥后待测。

1.4 生物测定

把一头触角完整、具产卵经验、未参加过任何测试、健壮、活泼具产卵欲的野蚕黑卵蜂引入上述待测的平底凹玻片中，观察其行为反应并记录其反应级别，级别记录标准分放弃、检验、接受三级：放弃指雌蜂触角敲打受测卵面时间少于5 s，记作1；检验指雌蜂触角敲打受测卵面时间超过5 s，但未表现出探查和钻入行为，记作2；接受指雌蜂检验后表现出探查和钻入行为，记作3。测定时环境温度为（25±2)℃，光照强度和投射方向各处理不变。每处理测定重复30头雌蜂。具体操作过程和方法参照文献［6］。

2 结果

2.1 高温对利它素活性的影响

实验结果表明：60℃和 100℃下各处理 30 min 与对照（25℃）相比其利它素活性未受影响（表 1）。性附腺粗提液涂布于人造卵表干燥后热处理（简称处理Ⅰ）的接受率分别为 73.33%、73.33%、70.00%；粗提液热处理后涂布于人造卵表（简称处理Ⅱ）则分别为 76.67%、80.00%、83.33%，各处理间的平均反应级数与对照经方差分析表明相互间无明显差异。

表 1　利它素的热稳定性试验结果

Table 1 The results of heat resistance of kairomone

处理 Treatment	温度（℃） Temperature	蜂数 Number of parasitoid	平均反应级数±标准差 Mean grade of response ± standard deviation	接受 Accepted （%）	检验 Examined （%）	放弃 Rejected （%）
Ⅰ	25（CK）	30	2.70±0.41	73.33	23.33	3.33
	60	30	2.67±0.41	73.33	20.00	6.67
	100	30	2.63±0.40	70.00	23.33	6.67
Ⅱ	25（CK）	30	2.73±0.42	76.67	20.00	3.33
	60	30	2.73±0.42	80.00	13.33	6.67
	100	30	2.77±0.42	83.33	10.00	6.67

2.2　低温对利它素活性的影响

性附腺粗提液经 4℃、0℃、－20℃和－70℃低温冷藏 135 天后生物活性测定的结果（表 2）表明，低温对利它素活性影响很小，仍能保持较高的生物活性，野蚕黑卵蜂对涂有各温度处理粗提液上清人造卵的接受率仍有 60.00%、56.67%、53.33% 和 56.67%，与对照（76.67%）相比虽有所降低，但方差分析结果表明平均反应级数间无明显差异。

表 2　粗提液不同温度下贮存 135 天后上清和凝集沉淀的生物测定结果

Table 2　Bioassay of supernatant and deposit of the crude extract after being stored for 135 days at different temperatures

粗提液 Semifinished kairomone	温度（℃） Temperature	蜂数 Number of parasitoid	平均反应级数±标准差 Mean grade of response ± standard deviation	接受 Accepted （%）	检验 Examined （%）	放弃 Rejected （%）
上清 Supernatant	4	30	2.40±0.37	60.00	20.00	20.00
	0	30	2.40±0.37	56.67	26.67	16.67
	－20	30	2.37±0.36	53.33	30.00	16.67
	－70	30	2.37±0.37	56.67	23.33	20.00
沉淀（8 mol/L 脲溶解） Deposit（urea solution）		30	2.55±0.31	70.33	16.67	13.00
8 mol/L Urea		30	1.00±0.00	0.00	0.00	100.00
对照 Control		30	2.67±0.41	76.67	13.33	10.00

2.3　低温对粗提液中利它素含量及活性的影响

不同低温处理，对粗提液中组成组分及各组分相对含量的影响较大。随着温度的降低，

粗提液中的凝聚沉淀明显增加，且0℃以下比4℃能产生的凝集沉淀更多，这些凝集沉淀很难再在水中溶解，但能被含8 mol/L尿素的水溶液缓慢溶解，将溶解后上清进行高效液相分析，发现只有一个峰（图2），而且其保留时间与对照（图3）中第一主组峰的保留时间相同，同时将上清涂布于人工卵上进行生物测定，发现对野蚕黑卵蜂仍有很好的引诱活性（表2）。

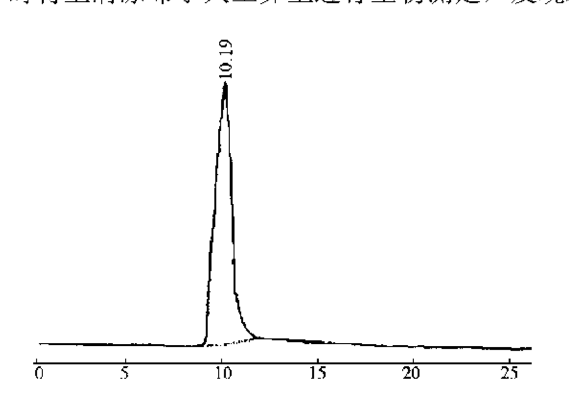


图2 低温凝聚沉淀物的高效液相色谱图

Fig. 2 Chromatogram of deposit formed at low temperature

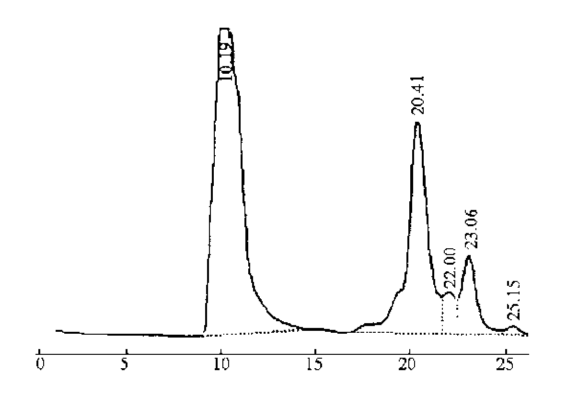


图3 粗提液（对照）的高效液相色谱图

Fig. 3 Chromatogram of crude extract (CK)

从各低温下贮存135天后进行的高效液相色谱分离结果（图4）及表3可发现，低温对粗提液中不同组分的影响程度不同，尤其是对第1和第2两大主组分。4℃贮存对第1主组分的保存比其它三种温度要有利，前者与对照相比的损失（44.1%）约为后者三种温度的平均损失（84.1%）的二分之一；而对第2主组分4℃时几乎完全降解，高效液相色谱检测不到它的存在，在其它三种温度中且保存较好，三者平均为对照的51.2%。4℃贮存还提高了第1组分在粗提液中的相对含量。

表3 不同温度处理对主组分含量的影响

Table 3 Effect of different temperatures on main component content

主组分 Main component	温度（℃） Temperature	保留时间（min） Retention time	峰面积 Peak area	比对照减少% Reduced percent to CK	占总组分% Percent of total components
第1主组分	CK	10.19	10 227 844	—	58.97
First main component	4	10.11	5 714 344	44.1	67.99
	0	10.32	1 791 378	82.5	26.97
	−20	10.33	1 335 504	86.9	19.86
	−70	10.36	1 733 042	83.0	23.89
第2主组分	CK	20.41	5 027 936	—	28.99
Second main component	4	20.40	HPLC检测不到		
	0	20.36	2 411 377	52.0	36.30
	−20	20.37	2 546 942	49.3	37.87
	−70	20.42	2 387 556	52.5	32.91

为了进一步探明低温引起的粗提液中发生的凝聚沉淀和利它素损失的关系，我们对 -70℃贮存后高效液相色谱分离各组分进行生物活性测定，发现第 1 主组分对野蚕黑卵蜂具有利它素活性，有 56.6%的野蚕黑卵蜂表现出检验并接受寄主的行为，其余各组分无利它素生物活性反应（表 4）。综合上述结果可说明低温引起粗提液产生的凝聚沉淀来源于第 1 主组分，且第 1 主组分具有利它素生物活性。

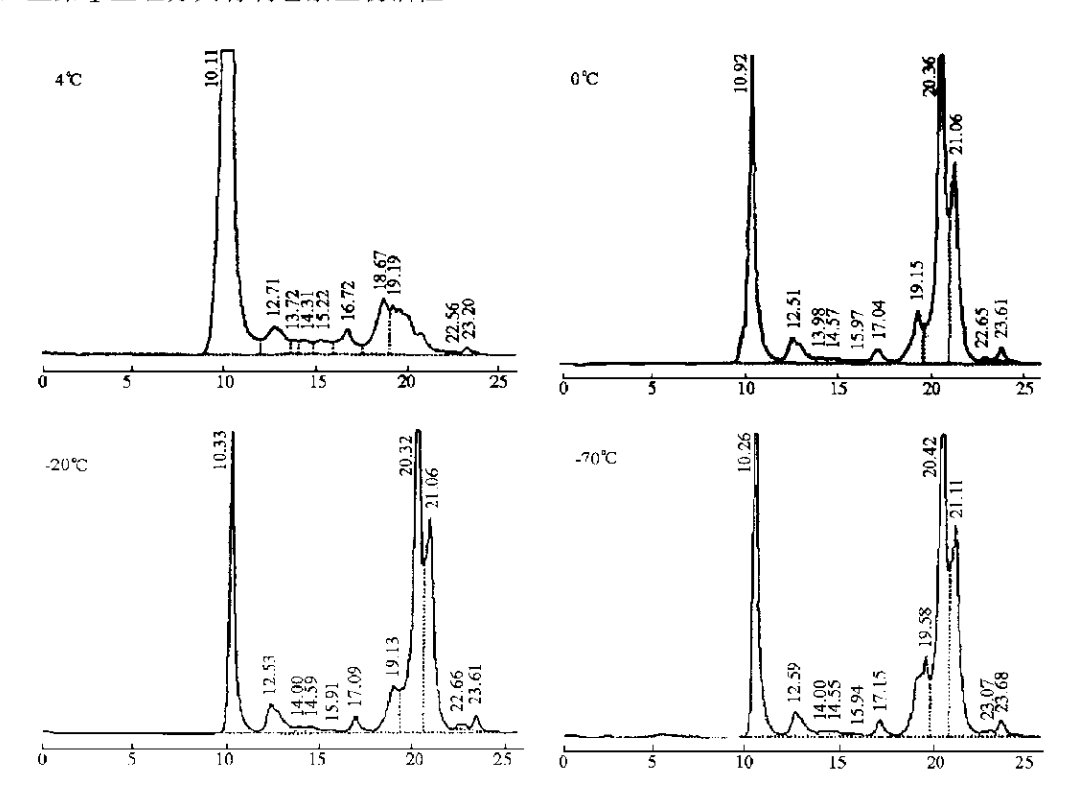


图 4　粗提液在 4℃、0℃、-20℃、-70℃下贮存 135 天后的 HPLC 色谱图

Fig. 4　Chromatograms of the crude extract after being stored for 135 days at 4℃，0℃，-20℃，-70℃

表 4　粗提物经 -70℃下保存 135 天后高效液相色谱分离组分的生物测定结果

Table 4　Bioassay of the components isolated with HPLC of the crude extract after being stored for 135 days at -70℃

保留时间（min） Retention time	蜂数 Number of parasitoid	平均反应级数 ± 标准差 Mean grade of response ± standard deviation	Duncan's 多重比较 Duncan's multiple comparisons	接受 Accepted （%）	检验 Examined （%）	放弃 Rejected （%）
10.26*	30	2.37 ± 0.37	a　A	56.67	23.33	20.00
12.59	30	1.03 ± 0.05	b　B	0.00	3.33	96.67
17.15	30	1.17 ± 0.11	b　B	0.00	16.67	83.33
19.58	30	1.10 ± 0.08	b　B	0.00	10.00	90.00
20.42**	30	1.03 ± 0.05	b　B	0.00	3.33	96.67
21.11	30	1.10 ± 0.08	b　B	0.00	10.00	90.00

* 为第 1 主组分 Showed first main component；＊＊为第 2 主组分 Showed second main component

3 讨论

昆虫雌蛾性附腺分泌物，尤其是在许多全变态昆虫中，常用作卵与产卵场所间的粘着，随着信息素研究的不断发展，已发现附腺分泌物除上述功能外，还有许多其它的功能，其中之一就是与寄生蜂的寄主识别和寄生有关[1~3,9]，这给害虫的生物防治拓展了一新的研究和应用领域，寄生蜂和寄主卵上的粘着物间的这种特定的信息联系，是寄主和寄生蜂间在长期的寄生与反寄生的不断进化中形成的。本研究发现含利它素的性附腺粗提液具有很好的热稳定性，认为这与寄主分泌此类物质的自身目的相一致，寄主在田间所产卵上的分泌物要承受严酷的环境条件，它若不能经受温度变化和雨水的冲刷使寄主卵仍然牢固地附着于产卵场所，就无法生存。寄生蜂在寄主产卵场所所不断接触和学习到的也正是此类物质。生物测定表明凝聚沉淀仍具利它素活性，这从另一方面说明了寄生蜂对此利它素的识别能力与利它素所存在的状态无关。我们在对野蚕黑卵蜂的生物学特性研究中发现，在自然生态环境中，尽管野蚕黑卵蜂有寄附现象，但在桑园的桑叶和枝杆等处，寄主卵一产下就被野蚕黑卵蜂寄生的概率仍较小，更多的是产出后的卵在一段时间内被野蚕黑卵蜂找到并寄生。

低温对利它素的活性没有明显影响，但能导致性附腺粗提液产生凝聚沉淀。对该沉淀的高效液相色谱行为分析和各分离组分的利它素活性生物测定结果，证实该沉淀即为粗提液中具利它素活性的第1主组分，这一发现对利它素的分离提纯和进一步的分子生物学研究具有重要意义。作者利用利它素这一特性，已建立了一套快速、简捷的精制利它素分离方法，成功地进行了利它素的氨基酸组成分析[12]；利它素对低温敏感从另一面提示我们对大量性附腺粗提液既要保持生物活性，又要不使其产生凝聚沉淀，不宜在0℃以下保存。从分离纯化目的出发，最好的途径是4℃保存一段时间后，再－20℃保存。这样，一方面4℃可使非利它素组分降解，从而提高利它素在粗提液中的相对含量，减少对粗提液中非利它素组分的干扰，另一方面利用利它素对低温的敏感性，使其快速从粗提液中分离出来，可为进一步进行利它素蛋白质的氨基酸序列分析等分子生物学研究提供足够研究试样。

参 考 文 献（References）

[1] Strand M R，Vinson S B. Analyses of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothodis*（Hymenoptera：Scelionidae），Isolation and host function. J. Chem. Ecol.，1983，9（3）：423～432

[2] Nordland D A，Strand W J，Lews W J. Role of kairomones from host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and *Trichogramm apretiosum* with partial characterization. Entomol. Exp. Appl.，1987，44：37～43

[3] 曹爱华，郭 林. 天敌昆虫黑卵蜂人工寄主卵研究：Ⅲ 松毛虫黑卵蜂 *Telenomus dendrolimusi* 在人工寄主卵上的产卵行为和产卵引诱物. 武汉大学学报：自然科学版，1990，4：103～108

[4] Strand M R，Vinson S B. Factors affecting host recognition and acceptance in the egg parasitoid *Telenomus heliothidis*（Hymenoptera：Scelionidae）. Environ. Entomol.，1983，12：1 114～1 119

[5] 高其康，胡 萃. 影响野蚕黑卵蜂寄主识别和接受的一些因素. 浙江农业大学学报，1997，23（6）：653～656

[6] Gao Q K，Hu C. Parasitical behavior of *Telenomus theophilae* We *et* Chen. Entomologia Sinica，1995，2（4）：330～336

[7] 高其康，胡 萃. 野蚕黑卵蜂触角感器的超微结构研究. 浙江农业大学学报，1993，19（4）：399～404

[8] 高其康，胡 萃. 野蚕黑卵蜂成虫触角化学感器的超微结构和功能. 电子显微学报，1995，4：261～268

[9] 高其康，胡 萃. 野蚕黑卵蜂寄主识别利它素的来源及性质. 浙江农业大学学报，1995，21（6）：583～587

［10］　笠井隆善·平泽德荣．家蚕雌蛾胶质腺の分泌せる胶质物にする关研究．蚕丝学报，1933，15（9）：595～615
［11］　有泽宜新．カイコガ雌胶质腺の发达とタンパク质合成．日本应用动物昆虫学会志，1990，34（3）：227～235
［12］　Gao Q K，Hu C. Rapid isolation and amino acid composition of an egg recognition kairomone of *Telenomus theophilae*（Hymenoptera：Scelionidae）. First Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology，1999．149

Influence of temperatures on the activity of host recognition kairomone of *Telenomus theophilae*

GAO Qi-kang，HU Cui
（Zhejiang University，Hangzhou　310029，China）

Abstract：Kairomone activities of crude extract from female accessory glands of *Bombyx mori* after being treated for 30 min at 25℃，60℃ and 100℃ were determined. The results showed that the extracted substance had strong attractive activity to *Telenomus theophilae* for all the 3 temperature treatments. The main grade of response at 60℃ or 100℃ showed no significant different from that at 25℃. This meant that the active substance was resistant to high temperature. At low temperature（4℃，0℃，－20℃ or －70℃）the substance kept active for eliciting *T*. *theophilae*，but these temperatures could cause deposition of the active component. The amount of deposit at 0℃ was larger than that at 4℃. At －20℃ the active component amounted to 13．1％ of the control according to HPLC analysis. This finding of sensitivity to low temperature is very importance for simplifying methods for isolation and purification of the kairomone.

Key words：*Telenomus theophilae*；kairomone；temperature